

Artigo de revisão bibliográfica

Mestrado Integrado em Medicina

**FISIOPATOLOGIA, DIAGNÓSTICO E NOVAS TERAPÊUTICAS DA
HEMOGLOBINÚRIA PAROXÍSTICA NOTURNA**

Bernardete Maria Torres Rodrigues

Orientador
Dra. Maria Luciana Gomes de Pinho

Porto, 16 de Junho de 2011

ARTIGO DE REVISÃO

**FISIOPATOLOGIA, DIAGNÓSTICO E NOVAS TERAPÊUTICAS DA
HEMOGLOBINÚRIA PAROXÍSTICA NOTURNA**

**PHYSIOPATHOLOGY, DIAGNOSIS AND NEW THERAPEUTICS OF
PAROXYSMAL NOCTURNAL HEMOGLOBINURIA**

Bernardete Maria Torres Rodrigues – ICBAS-UP

berna.rodri@gmail.com

Ano Lectivo 2010/2011

HPN: fisiopatologia, diagnóstico e terapêutica

Resumo

A hemoglobinúria paroxística noturna é uma doença rara das células estaminais hematopoiéticas que se manifesta por hemólise intravascular, falência da medula óssea e trombose. A expansão clonal de uma célula estaminal hematopoiética com uma mutação somática adquirida no gene ligado ao X, glicosilfosfatidilinositol glicano classe A, leva à ausência total ou parcial de várias proteínas de superfície que se ligam à membrana celular através do glicosilfosfatidilinositol.

O mecanismo pelo qual ocorre a expansão clonal ainda não é conhecido, mas células T autorreactivas parecem estar envolvidas na seleção imune que favorece a sobrevivência do clone com a mutação. Também foi proposta a ocorrência de uma segunda mutação que confere vantagem ao clone mutado.

A hemólise intravascular mediada pelo complemento deve-se à ausência de duas proteínas reguladoras do complemento. O aumento da hemoglobina livre no plasma e conseqüente depleção do óxido nítrico são responsáveis por muitas das manifestações clínicas da doença. O óxido nítrico também foi implicado no mecanismo de trombose, assim como as plaquetas e a fibrinólise.

Os testes baseados no complemento, inicialmente utilizados no diagnóstico da doença, foram substituídos pela citometria de fluxo, uma técnica mais sensível que permite quantificar o tamanho do clone nas várias linhagens celulares. A citometria de fluxo pode utilizar anticorpos monoclonais ou uma variante inactiva da toxina aerolisina, ambos ligam as proteínas ancoradas ao glicosilfosfatidilinositol.

O tratamento da doença foi recentemente revolucionado com a introdução do anticorpo monoclonal, eculizumab, que se liga especificamente à proteína C5 do complemento e bloqueia os efeitos das proteínas do complemento terminal. O eculizumab diminui a hemólise intravascular, estabiliza os níveis de hemoglobina, reduz a necessidade de transfusões e melhora a qualidade de vida dos doentes.

Esta revisão pretende expôr em que medida a atual compreensão dos mecanismos da doença alterou o diagnóstico e tratamento e lançou novos desafios.

Palavras-chave: hemoglobinúria paroxística noturna, PIG-A, GPI, complemento, NO, expansão clonal, citometria de fluxo, FLAER, eculizumab.

Abstract

Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria is a rare disease of hematopoietic stem cell that manifests with intravascular hemolysis, bone marrow failure and thrombosis. The clonal expansion of a hematopoietic stem cell with an acquired somatic mutation in the X-linked phosphatidylinositol glycan class A, leads to total or partial lack of several surface proteins that bind to the cell membrane through glycosylphosphatidylinositol.

The mechanism of clonal expansion is still unknown but autoreactive T cells appear to be involved in immune selection that favors the survival of the clone with the mutation. Also was proposed the occurrence of a second mutation that confers growth advantage to the mutant clone.

Complement mediated intravascular hemolysis is due to absence of two complement regulatory proteins. Increase in plasma free hemoglobin and consequent depletion of nitric oxide are responsible for many of the clinical manifestations of disease. Nitric oxide also was implicated in the thrombosis mechanism, as well as platelets and fibrinolysis.

Complement based tests, initially used in disease diagnosis, were replaced by flow cytometry, a more sensitive technique to quantify the clone size in various cell lines. Flow cytometry can use monoclonal antibodies or an inactive variant of the toxin aerolysin, both bind to glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins.

Treatment of the disease has recently been revolutionized with the introduction of monoclonal antibody, eculizumab, which binds specifically to C5 complement protein and blocks the effects of terminal complement proteins. Eculizumab reduces intravascular hemolysis, stabilizes hemoglobin levels, reduces the need for transfusions and improves patients quality of life.

This review intends to expose the extent to which the current understanding of disease mechanisms changed the diagnosis and treatment and has brought new challenges.

Keywords: paroxysmal nocturnal hemoglobinuria, PIG-A, GPI, complement, NO, clonal expansion, flow cytometry, FLAER, eculizumab.

Introdução

A hemoglobinúria paroxística noturna (HPN) é uma doença rara com uma prevalência de 1,59 casos por 100.000 pessoas e uma incidência anual de 0,13 por 100.000 pessoas.¹

Na definição clássica, a doença é caracterizada por crises de hemólise intravascular e hemoglobinúria, que ocorrem predominantemente durante a noite, enquanto o doente dorme. Este padrão clássico, contudo, está ausente na maioria dos doentes no momento do diagnóstico.² Clinicamente, a doença caracteriza-se por hemólise intravascular, trombose e falência da medula óssea (MO).^{3,4} A hemólise intravascular é um processo crônico que ocorre em baixo grau, com episódios ocasionais de hemoglobinúria que, normalmente surgem associados a um quadro infeccioso ou situações de *stress*.² Os sintomas característicos da HPN como dor abdominal, disfagia, disfunção erétil e fadiga podem ser atribuídos à hemólise intravascular intensa e consequente libertação de hemoglobina livre, tendo um grande impacto na qualidade de vida dos doentes.⁵ A sobrevivência média desde o diagnóstico é de 10 a 15 anos, contudo uma proporção significativa de doentes sobrevive por períodos mais prolongados como 25 anos, e cerca de 15% recuperam espontaneamente.⁶ A complicação mais frequente e temida é a trombose venosa que ocorre em mais de metade dos doentes com doença hemolítica e é causa de morte num terço dos doentes.^{6,7}

A HPN pode surgir *de novo* ou no contexto de outra doença. Foi criado um sistema de classificação com base nas características, manifestações clínicas e história natural dos doentes com HPN. A HPN clássica inclui os doentes com evidência clínica de hemólise intravascular sem outras anomalias na MO. A HPN no contexto de outra doença da MO refere-se a doentes com evidência clínica e laboratorial de hemólise intravascular e que, concomitantemente, têm ou tiveram outra doença: anemia aplástica (AA), síndrome mielodisplásica (SMD) ou outra mielopatia. A HPN subclínica caracteriza-se por inexistência de evidência clínica e laboratorial de hemólise, mas com pequenas populações de células hematopoiéticas deficientes em proteínas ancoradas ao glicosilfosfatidilinositol (GPI) detetadas na citometria de fluxo. Esta forma é observada em associação com outras síndromes de falência da MO.³ Apesar de diferentes apresentações clínicas e fatores de prognóstico entre a forma clássica e a forma associada a AA, o prognóstico não parece ser diferente e é

afetado principalmente por complicações que ocorrem após o diagnóstico, nomeadamente a trombose, principal fator de prognóstico em ambas as categorias.⁸

O conhecimento acerca dos mecanismos moleculares responsáveis pela doença aumentou substancialmente nas últimas duas décadas com implicações quer, nos métodos de diagnóstico quer, no tratamento. Este trabalho pretende rever o estado atual sobre a fisiopatologia da doença, a evolução dos meios diagnósticos e as novas terapêuticas da HPN.

Fisiopatologia

O progresso na compreensão dos mecanismos responsáveis pelas manifestações clínicas da HPN tem sido contínuo. A primeira descrição da doença foi feita por Strübing, em 1882, que propôs que a hemoglobinúria seria consequência da sensibilidade anormal dos eritrócitos à acidose sistémica, resultante da acumulação de dióxido de carbono durante o sono. Em 1939, Ham e Dingle observaram que os eritrócitos eram hemolisados quando incubados em soro acidificado, levando à introdução do teste de Ham, que se tornou o principal meio de diagnóstico durante muito tempo. Posteriormente, com a descoberta da via alternativa do complemento, a sensibilidade aumentada dos eritrócitos HPN foi então atribuída à lise mediada pelo complemento.⁹

Uma das principais características da HPN é o mosaicismo fenotípico, com base na sensibilidade dos eritrócitos à lise mediada pelo complemento. Esta característica foi primeiro elucidada por Dacie e Rosse, em 1966, e depois por Rosse, em 1973, com o teste de lise ao complemento, em que demonstrou três populações diferentes de eritrócitos. O fenótipo HPN I apresenta sensibilidade normal ao complemento. Os eritrócitos HPN III são 15 a 25 vezes mais suscetíveis à lise pelo complemento e os eritrócitos HPN II têm sensibilidade intermediária, com cerca de 3 a 5 vezes mais suscetibilidade.²

Posteriormente, identificou-se a deficiência de dois inibidores de membrana como sendo responsável pelo aumento da sensibilidade ao complemento e, finalmente, a deficiência da âncora que liga essas proteínas, entre outras, à membrana e a mutação no gene que origina essa deficiência.⁹

A mutação no gene PIG-A

A HPN resulta da expansão clonal de uma célula estaminal hematopoiética com uma mutação somática no gene fosfatidilinositol glicano classe A (PIG-A), localizado no cromossoma X.^{10,11,12} O PIG-A codifica uma enzima necessária para o primeiro passo na síntese da âncora glicosilfosfatidilinositol (GPI), a transferência de N-acetil glucosamina para o fosfatidilinositol o que, conseqüentemente, resulta na ausência de proteínas ancoradas ao GPI na superfície celular.^{13,14,15} A ligação de muitas glicoproteínas de superfície à membrana celular ocorre através do GPI,^{16,17} e, até à data, foram descritos cerca de 20 antígenos diferentes ausentes nas células HPN.^{7,17} Mais de 20 genes e 10 reações estão envolvidos na formação do GPI, mas a HPN resulta de uma mutação em apenas um gene, o PIG-A.¹⁶ Este gene localiza-se no braço curto do cromossoma X (Xp22.1), enquanto todos os outros são autossômicos, logo uma simples mutação resulta na síntese deficiente de proteínas ancoradas ao GPI em homens, porque só tem um cromossoma X e em mulheres, porque sofrem inativação do X.^{16,18} A mutação ocorre após a inativação do X, pelo que a frequência da doença é igual entre homens e mulheres.¹⁸

Foram descritas mais de 180 mutações, com poucas repetições.^{19,20} A maioria das mutações são pequenas inserções ou deleções que resultam em mutações *frameshift* e tornam o gene não-funcional, levando a deficiência completa das proteínas ancoradas ao GPI nas células.^{21,22} Uma minoria das mutações são mutações pontuais, habitualmente *missense*, que originam células com deficiência completa das proteínas ancoradas ao GPI ou células com alguma expressão das proteínas, pois a enzima codificada pelo gene PIG-A apresenta função residual.^{7,20} A diferença na sensibilidade dos eritrócitos à lise mediada pelo complemento é explicada pela deficiência das proteínas ancoradas ao GPI.¹⁷ Os eritrócitos HPN III têm deficiência completa das proteínas, enquanto os eritrócitos HPN II apresentam apenas uma deficiência parcial. As células tipo I têm expressão normal das proteínas ancoradas ao GPI.²³ A análise das proteínas ancoradas ao GPI na superfície das células hematopoiéticas HPN revela que aproximadamente 40% dos doentes tem uma combinação dos tipos I, II e III.⁴ A variabilidade na gravidade da deficiência bem como na proporção das células afetadas é relevante nas manifestações clínicas da doença.²³ Este mosaicismo fenotípico é a consequência do mosaicismo genotípico.²⁴ Estudos relatam doentes com múltiplos clones HPN,^{24,25,26} também presentes nos doentes com AA em simultâneo,²⁵ e, foi identificado um doente que apresentava

quatro mutações somáticas distintas.²⁶ Foi, portanto, sugerido que o gene PIG-A seria hipermutável. No entanto, outro estudo demonstrou uma taxa de mutação normal e, portanto, a instabilidade genética do gene PIG-A não parece ser um fator na patogênese da doença.²⁷

As mutações no gene PIG-A são relativamente comuns em indivíduos normais. No entanto, enquanto os doentes com HPN apresentam mutações PIG-A clonais que envolvem todas as linhagens celulares (mieloide, eritroide e linfoide), as mutações PIG-A de controlos normais são policlonais e não envolvem os linfócitos, ocorrendo a nível das células formadoras de colónias e, provavelmente fazem parte do processo normal de diferenciação.^{22,28} Ao contrário das células estaminais hematopoiéticas, as células formadoras de colónias não tem capacidade de autorrenovação e, portanto, a mutação não se propaga.^{22,28} Os controlos saudáveis podem ter até 0,005% de células HPN não clonais e resultados de menos de 0,01% provavelmente não são clonais e não são relevantes.²²

Recentemente, foi descrita uma deficiência de GPI hereditária autossómica recessiva em duas famílias resultante de uma mutação no gene PIG-M, que codifica outra enzima essencial à síntese do GPI.²⁹ Contudo, o fenótipo difere pois origina uma síndrome clínica caracterizada por propensão a trombose e tonturas na ausência de hemólise significativa.³⁰

Complemento e hemólise intravascular

As células hematopoiéticas possuem várias proteínas ancoradas ao GPI, incluindo antigénios do grupo sanguíneo, moléculas de adesão, proteínas reguladoras do complemento, enzimas e recetores. O CD55 ou DAF (*decay accelerating factor*) e o CD59 ou MIRL (*membrane inhibitor of reactive lysis*) são proteínas ancoradas ao GPI, amplamente expressas nas células hematopoiéticas e suas linhagens.¹⁶ O CD59 interage diretamente com o complexo de ataque membranar (MAC) para prevenir a formação dos poros líticos bloqueando a agregação do C9,³¹ enquanto o CD55 acelera a destruição da C3 convertase.^{32,33} As proteínas reguladoras do complemento, CD55 e CD59, são as mais relevantes na fisiopatologia da HPN, a sua ausência explica a hemólise intravascular mediada pelo complemento e, provavelmente, a propensão para a trombose. O CD59 é o mais importante na proteção das células ao complemento.^{34,35} No entanto, a expressão diminuída do CD55 e CD59 não é

específica da HPN e pode ser encontrada em doentes com diversas doenças autoimunes.³⁶

O sistema complemento consiste em mais de 30 proteínas que interagem de forma precisa levando à geração de produtos com propriedades imunoprotectoras, imunoreguladoras, proinflamatórias e citolíticas. Existem três vias pelas quais o complemento é ativado: a via clássica, a via da lecitina e a via alternativa. Todas elas resultam na geração de C3 convertase que cliva o C3 em C3a e C3b.³⁷ Os eritrócitos HPN são vulneráveis à ativação do complemento através de qualquer uma das vias, no entanto, a via alternativa está num estado de ativação de baixo grau contínuo que explica porque é que a maioria dos doentes têm hemólise crónica.³⁸ O tempo de vida dos eritrócitos HPN encontra-se reduzido em 10% relativamente às células normais,³⁹ e correlaciona-se com a externalização de fosfatidilserina e perda de glicoforinas da sua superfície membranar.⁴⁰

O CD55 e o CD59 também são deficientes nos leucócitos e nas plaquetas.^{16,41} Contudo, não há evidência de uma redução na semivida dos leucócitos, provavelmente porque tem um inibidor do complemento adicional (CD46).⁴²

O papel do NO

O óxido nítrico (NO) é um regulador potente da fisiologia vascular e muitas das manifestações clínicas da HPN são explicadas pela depleção do NO a nível dos tecidos.^{5,43} No endotélio, oxigénio e arginina reagem com a enzima óxido nítrico sintetase produzindo NO e citrulina. O NO mantém o tónus da parede vascular e limita a ativação das plaquetas. A hemoglobina livre do plasma tem uma enorme afinidade para o NO e funciona como um potente “*scavenger*” do NO.^{16,38} Em condições normais, a hemoglobina livre é rapidamente sequestrada pela membrana celular do eritrócito mas, na HPN, a sensibilidade dos eritrócitos ao complemento leva a hemólise intravascular massiva com libertação de grandes quantidades de hemoglobina e arginase para o plasma.^{5,16,38,43} Isto resulta em “*scavenging*” do NO e diminuição do substrato arginina para a produção do NO.^{5,43,44} A haptoglobina é um mecanismo compensatório para a remoção da hemoglobina livre, mas a concentração desta na HPN excede a capacidade da haptoglobina remover a hemoglobina do plasma.^{5,43}

A depleção do NO leva a manifestações clínicas como fadiga, dor abdominal, espasmo esofágico, disfunção erétil e, possivelmente, trombose que são muito mais comuns nos doentes com grandes populações de clones HPN.⁴⁵

Mecanismos de trombose

A trombose é uma das complicações da HPN e a principal causa de morte, que ocorre em cerca de 40% dos doentes e envolve predominantemente o sistema venoso.⁶ Doentes com clones de granulócitos superiores a 60% parecem ter maior risco de trombose e, de acordo com o modelo de regressão logística, uma alteração de 10% no tamanho do clone HPN, a *odds ratio* estimada para risco de trombose é de 1,64.⁴⁵

Apesar do mecanismo de trombose não ser completamente conhecido, parece haver um papel da hemólise intravascular e suas consequências. O NO inibe a agregação plaquetária, induz a desagregação das plaquetas agregadas e inibe a adesão das plaquetas através do aumento dos níveis de cGMP.^{5,47} De facto, fármacos que aumentam os níveis sistêmicos de NO mostraram inibir a agregação plaquetária.⁴⁶ Pelo contrário, o “*scavenging*” do NO pela hemoglobina ou a diminuição da sua produção pela inibição do metabolismo da arginina resulta no aumento da agregação plaquetária.⁴⁸ Além disso, o NO também interage com componentes da cascata da coagulação para regular a formação de coágulos.⁵

As plaquetas HPN são significativamente mais sensíveis à ativação pelas proteínas C5b-9 do complemento levando à geração de trombina, que poderá contribuir para o risco trombótico da doença.^{39,49} As plaquetas ativadas libertam pequenas vesículas contendo MAC e essas microvesículas com fosfatidilserina, um potente procoagulante, estão presentes em elevados níveis nos doentes com HPN.^{39,50,51} Além disso, as células endoteliais também libertam micropartículas quando estimuladas, presentes igualmente em níveis elevados na HPN, e cujo fenótipo pró-trombótico e pró-inflamatório é consistente com um processo vascular inflamatório crónico.⁵²

Por sua vez, a fibrinólise também parece estar afetada, uma vez que monócitos e granulócitos de doentes com HPN são deficientes em recetor celular do ativador do plasminogénio tipo uroquinase (u-PAR), ligado ao GPI, e que poderá estar relacionado com a elevada incidência de trombose nestes doentes.⁵³ Recentemente, foi demonstrado que o inibidor do fator tecidual (TFPI) necessita de um corrector ligado ao GPI que funciona como uma chaperona para o transportar até à superfície

celular endotelial. Consequentemente, o TFPI é degradado no interior da célula e a sua ausência poderá contribuir para as complicações trombóticas.⁵⁴

Um estudo recente demonstrou que a deficiência de proteínas ancoradas ao GPI afeta a expressão de outras proteínas. A proteinase 3 (PR3) e a glicoproteínas NB1 (CD177) ancorada ao GPI estão colocalizadas na membrana plasmática dos neutrófilos, e a deficiência do GPI na HPN resulta em níveis diminuídos de PR3. A deficiência de NB1-PR3 nos neutrófilos de doentes com HPN e a diminuição associada dos níveis circulantes de PR3, podem afetar a ativação das plaquetas através da deficiente clivagem do recetor da trombina nas plaquetas PAR-1, mediada pela PR3, tornando o recetor sensível à trombina. Este poderá constituir outro mecanismo que contribui para a propensão à trombose.⁵⁵

Expansão clonal

As mutações no gene PIG-A ocorrem a nível da célula estaminal hematopoiética multipotente mas, o mecanismo da expansão clonal continua por esclarecer.⁵⁶ Existem algumas hipóteses propostas para explicar este mecanismo. Um modelo de dois passos propõe que as mutações PIG-A nas células estaminais hematopoiéticas são benignas e estas sofrem expansão clonal no contexto de seleção imune, que afeta as células normais e poupa as células HPN.¹⁷ Foi sugerido que a expansão do clone HPN se deve à seleção somática de células, resultante da presença de células T autorreativas que reconhecem proteínas ancoradas ao GPI.^{57,58} Foi relatada uma frequência aumentada de expansões clonais de células T em doentes com HPN, que suporta a teoria de um mecanismo mediado por células T na patogénese da doença.^{59,60} Por outro lado, alguns estudos mostraram que células deficientes em proteínas ancoradas ao GPI são resistentes à apoptose.⁶¹ Contudo, não há correlação entre a resistência à apoptose e a proporção de células com o fenótipo HPN, indicando que o fenótipo resistente poderá ser independente da mutação PIG-A. Além disso, o fenómeno apoptótico também é observado noutras doenças como AA e SMD,⁶² e a correção da deficiência pela introdução de cDNA do PIG-A não altera a taxa de apoptose.⁶³ Um estudo usou um modelo de linhagem celular com a expressão do PIG-A sob controle, e mostrou que as mutações PIG-A contribuem para a expansão clonal, sendo as células deficientes em proteínas ligadas ao GPI resistentes à apoptose.⁶⁴ Células CD34⁺ com mutação no PIG-A tiveram crescimento e diferenciação semelhante às células CD34⁺ de controlos normais, não evidenciando

uma vantagem intrínseca mas, antes a sobrevivência preferencial das células HPN parece resultar do crescimento deficiente das células não mutadas em doentes com HPN, que expressam intensamente o recetor Fas (CD95).⁶⁵ A resistência à apoptose pode estar relacionada com a disrupção dos “*lipid rafts*”, microdomínios de superfície celular compostos por esfingolípidos, colesterol e proteínas ancoradas ao GPI. Um estudo demonstrou que as células deficientes em GPI tem composição e sinalização alterada dos “*lipid rafts*”, com importantes proteínas antiapoptóticas, não encontradas nas células GPI⁺. A sinalização dependente dos “*lipid raft*” nas células HPN pode induzir respostas diferentes às citocinas pró-inflamatórias.⁶⁶ Por outro lado, as células deficientes em GPI são menos suscetíveis às células *natural killer* (NK).⁶⁷ Foi demonstrado que a sobrevivência preferencial do clone HPN pode ser atribuída à deficiência das proteínas de membrana ancoradas ao GPI induzidas pelo *stress*, ULBP1 e ULBP2, ligandos dos recetores NKG2D, que são recetores das células T e NK, ativando-as.⁶⁸ Os doentes com doenças da MO parecem ser expostos ao *stress*, que induz os ligandos NKG2D nas células da MO e periféricas, e há uma resposta favorável da falência medular na HPN, AA e SMD através da interrupção da imunidade mediada com anticorpos contra os ligandos.⁶⁹ Foi relatado um aumento da expressão de isoformas que ativam os recetores *Killer immunoglobulin-like* (KIR) nas células T de doentes com HPN, moléculas membros da superfamília de recetores inibidores (SRI).⁷⁰ Ao contrário de sujeitos normais, nos doentes com HPN, a ligação destas moléculas ativam as células T, sendo as células GPI menos sensíveis à citólise.⁷⁰ Num pequeno número de doentes com HPN, foi demonstrado que as células mutadas são mais resistentes aos efeitos do interferão gama (IF γ) e ao fator de necrose tumoral alfa (TNF- α).⁷¹ A análise da expressão genética de células CD34 da MO mostrou que células normais GPI⁺ tinham “*upregulation*” de genes envolvidos na resposta imune e apoptose e, por outro lado, “*downregulation*” de genes associados a funções antiapoptóticas e de proliferação e diferenciação de células hematopoiéticas.⁷²

Outra das hipóteses propõe que mutações adicionais são necessárias para a expansão do clone HPN. Foram descritos dois doentes com HPN, em que o rearranjo do cromossoma 12 produziu expressão aberrante de HMGA2, membro do grupo de proteínas de alta mobilidade, que funciona como fator de transcrição arquitetural e que também está presente em tumores mesenquimais benignos.⁷³ Contudo, um estudo

subsequente sugeriu que a desregulação do HMGA2 não é um mecanismo major na explicação da expansão clonal na HPN.⁷⁴

Mais recentemente, foi proposto que as mutações PIG-A ocorrem espontaneamente nas células estaminais hematopoiéticas multipotentes através de um processo estocástico e a HPN clínica pode surgir sem que o clone HPN tenha vantagem na sobrevivência.⁷⁵

Diagnóstico

O diagnóstico da HPN evoluiu ao longo do tempo e, os clássicos testes bioquímicos têm sido substituídos pela citometria de fluxo. O teste de Ham foi, durante muito tempo, o meio de diagnóstico padrão para identificar o clone HPN nos eritrócitos. Apenas uma outra patologia, multinuclearidade eritropoiética hereditária com resultado positivo para o teste do soro acidificado (HEMPAS), ou anemia diseritropoiética congênita (CDA) tipo II, apresenta positividade no teste de Ham, mas é facilmente diferenciada pela história clínica, pela morfologia do aspirado medular e pelo teste de lise da sacarose negativo. Esta técnica baseia-se no princípio de que o complemento se liga aos eritrócitos em meio ácido e os eritrócitos HPN são sensíveis à fixação do complemento.^{76,77}

Por sua vez, o teste de lise da sacarose foi utilizado no rastreamento da HPN. Numa solução isotônica de sacarose a baixa força iônica, há agregação das globulinas séricas que fixam o complemento. Quando o soro é adicionado à solução, há lise preferencial dos eritrócitos HPN devido à sua sensibilidade ao complemento, relativamente aos eritrócitos normais.^{76,77,78} Este teste de execução muito simples, é considerado positivo se a hemólise for superior a 5%, mas resulta em mais falsos positivos relativamente ao teste de Ham.⁷⁸

O teste de Ham e o de lise da sacarose não são específicos para a doença, só detetam o defeito proteico nos eritrócitos e deixam de ter utilidade após transfusão devido à ocorrência de resultados falsos negativos.⁷⁹ Além disso, não tem sensibilidade suficiente para detetar populações pequenas de células HPN nem possibilitam a avaliação do tamanho real do clone HPN, e não diferenciam as células com deficiência parcial ou completa das proteínas ligadas ao GPI.^{80,81}

O teste de sensibilidade de lise ao complemento (CLS) avalia a proporção e os tipos de eritrócitos HPN com mais eficácia. Mas este teste é tecnicamente muito laborioso e difícil e não tem utilidade no diagnóstico de rotina.^{81,82}

Um teste de cartão em gel (“*gel card test*”), baseia-se no princípio da hemaglutinação após uma reação antígeno-anticorpo e deteta eritrócitos deficientes em CD55 e CD59.⁸² A sensibilidade varia entre 2 a 10% para os eritrócitos HPN tipo III.⁸³ Apesar de ser de realização e interpretação simples, não é quantitativo nem sensível na detecção de pequenos clones.⁸²

A citometria de fluxo veio substituir o teste de Ham no diagnóstico definitivo da HPN. Ao contrário dos testes líticos, esta técnica permite a análise de todas as populações do sangue periférico: eritrócitos, plaquetas e leucócitos.⁸⁴ A expressão das proteínas ancoradas ao GPI varia grandemente nas diversas subpopulações de células hematopoiéticas⁸⁵ e nos diferentes estádios de maturação.⁸⁶ A seleção de qual, ou quais os anticorpos a utilizar para identificar a doença continua em estudo e constitui uma escolha individual.⁸⁷ O CD55 e CD59 estão presentes em todos os tipos de células hematopoiéticas, incluindo populações *minor* de células dendríticas e linfócitos, apesar de expressos em níveis diferentes.⁸⁵ A detecção de baixos níveis de CD55 e CD59 é consistente com a doença. O antígeno CD59 é mais prevalente na membrana, e a quantificação das células HPN tipo I, II ou III é mais fácil com este anticorpo comparativamente ao CD55.⁷⁷ Os anticorpos anti-CD55 e anti-CD59 são os mais utilizados: são expressos universalmente nas diferentes populações de células e a sua expressão anormal está correlacionada com o comportamento clínico da doença. No entanto, existe uma grande variabilidade de resultados com os diferentes protocolos utilizados na citometria de fluxo. De facto, a preparação do protocolo tem um impacto significativo na qualidade dos resultados.⁸⁴ Foi demonstrado que a quantidade de CD59 nas células normais, HPN I e II diminui gradualmente quando a célula é armazenada e a fração de células anormais diminui com o tempo, pelo que a análise deverá ser efetuada imediatamente após a colheita das amostras. A fluorescência média obtida com as células GPI⁺ HPN I é menor em comparação com as células de controlos normais, o que sugere que as células HPN I da HPN poderão não ser inteiramente normais.⁸⁰

A citometria de fluxo nos eritrócitos pode ser utilizada para quantificar os clones de células HPN I, II e III em doentes não transfundidos, ou durante um período de, pelo menos, um mês sem transfusões.³ Segundo as recomendações, a citometria de fluxo nos eritrócitos deve avaliar simultaneamente dois antígenos ancorados ao GPI (CD55 e CD59) através de anticorpos monoclonais, devendo ser deficientes em ambas as proteínas.⁸² As raras deficiências congénitas das moléculas reguladoras do

complemento (CD55 e CD59), são distinguidas da HPN pelo facto de, 100% das células expressarem a deficiência e, apenas uma das proteínas ser deficiente, ao contrário do que acontece na HPN.^{80,82} A análise dos eritrócitos é significativamente superior quando se utiliza o anticorpo anti-CD59 relativamente ao anticorpo anti-CD55.^{80,85,88,89} A fluorescência média obtida com o anti-CD55 não permite uma distinção tão evidente entre as populações normal e deficiente,⁸⁰ e resulta em mais falsos negativos.⁸⁹ Por outro lado, o anti-CD59 permite uma melhor diferenciação dos eritrócitos com expressão intermediária das proteínas ancoradas ao GPI.⁸⁰ O anticorpo anti-CD59 é um marcador mais sensível no diagnóstico da HPN, sendo o papel do anticorpo anti-CD55 questionável.⁸⁹

O tamanho do clone HPN é determinado com mais precisão nos leucócitos uma vez que a sua meia-vida é normal, ao contrário dos eritrócitos em que é diminuída devido à hemólise, além se serem diluídos com a realização de transfusão, o que subestima o valor do resultado.^{77,89} No entanto, a determinação do CD55 e CD59 é tecnicamente mais conveniente quando efetuada nos eritrócitos quer, porque a viabilidade dos leucócitos é questionável 24 horas após a colheita quer, porque permite uma determinação mais precisa das subpopulações HPN II e III, que pode prever o fenótipo clínico da doença.^{80,81,89} As células HPN II são mais difíceis de demonstrar nos granulócitos que nos eritrócitos.⁸⁰ Ao contrário do que acontece nos eritrócitos, a expressão do CD55 nas diferentes subpopulações de leucócitos, à exceção dos eosinófilos, é superior ou semelhante ao CD59.⁸⁵

A padronização da técnica para marcar os granulócitos é mais difícil e existem vários métodos descritos.⁸² A distinção entre as diferentes populações bem como a sua proporção são menos claras quando a técnica utiliza uma amostra sem separação entre os granulócitos e os outros componentes sanguíneos.⁸⁰ À medida que os granulócitos perdem viabilidade *in vitro*, os níveis de ligação não específica aos anticorpos e a fluorescência aumentam.⁸¹ Na citometria de fluxo dos granulócitos, é recomendado utilizar anticorpos contra dois antigénios ancorados ao GPI e outro anticorpo contra um antigénio transmembranar não ancorado ao GPI, como controlo positivo. É preconizada a avaliação dos dois antigénios, CD55 e CD59, devido às raras doenças hereditárias anteriormente referidas, em que não há expressão de um ou de outro antigénio e, para excluir problemas técnicos.^{77,81}

Os monócitos HPN têm sido identificados pela deficiência em CD14, CD55, CD59 ou CD48 e, apesar de não haver consenso, o CD14 e CD55 são preferidos pela

maioria dos autores.⁸¹ A análise dos monócitos é tecnicamente difícil, uma vez que o seu número absoluto é, normalmente, baixo nos doentes com HPN.⁸² Existe elevada concordância entre o tamanho do clone HPN nos monócitos e nos granulócitos, o que está de acordo com o facto de ambos derivarem do mesmo precursor mieloide.^{81,82,90} Nos monócitos, o antigénio CD59 não é o alvo ideal para avaliar a deficiência das proteínas ancoradas ao GPI, um segundo anticorpo é necessário, como o anti-CD14.⁹¹ A avaliação adicional dos monócitos proporciona maior sensibilidade na deteção da deficiência de proteínas ancoradas ao GPI, principalmente nos doentes com populações de granulócitos deficientes <10%.⁹²

A análise dos linfócitos pela citometria de fluxo ainda não foi aceite no diagnóstico da HPN. A expressão das proteínas ancoradas ao GPI nos linfócitos de indivíduos saudáveis e com HPN é altamente variável.⁹³ Os linfócitos têm uma vida longa e só os que se desenvolvem após o início da doença têm deficiência das proteínas ancoradas ao GPI.^{81,82,90} A proporção de células HPN B, T e NK é muito menor comparativamente à dos granulócitos.⁸¹ No entanto, um estudo mostrou que a expressão de CD59 nas células B tem uma sensibilidade de 100% e especificidade de 97,4% no diagnóstico de HPN, tendo a avaliação das células B a mesma precisão que a dos granulócitos.⁹³ O anticorpo CD48 proporciona uma separação mais exata entre células normais e células HPN T, B e NK.⁹⁴ O estudo dos linfócitos em doentes com remissão espontânea da doença mostrou que células B e T deficientes em proteínas ancoradas ao GPI podem persistir vários anos após a normalização dos granulócitos e eritrócitos.⁹⁵

A deteção de reticulócitos deficientes em GPI é mais sensível que a análise dos eritrócitos e apresenta melhor correlação com a proporção de leucócitos deficientes.⁹²

A deficiência das proteínas ancoradas ao GPI pode ser demonstrada nas plaquetas, contudo, a diferença na fluorescência entre as plaquetas normais e HPN é pequena e a distinção entre as plaquetas HPN I e III é difícil e imprecisa.^{80,81} Uma proporção superior a 10% de plaquetas normais não expressa os dois antigénios CD55 e CD59.⁸¹ A utilidade diagnóstica e relevância clínica da avaliação das plaquetas ainda não foi estabelecida.⁸²

A maioria das técnicas de citometria de fluxo utiliza os leucócitos, nomeadamente os granulócitos e os monócitos. A quantificação do clone HPN é mais precisa quando se utilizam granulócitos e monócitos, em vez de eritrócitos e

linfócitos.^{77,88} Contudo, a imunofenotipagem dos eritrócitos e granulócitos pela citometria de fluxo é o método de escolha para o *screening*, diagnóstico e monitorização da HPN.³ O uso combinado de *kits* comerciais (CELLQUANT e REDQUANT) constitui uma técnica simples, rápida, padronizada e sensível no *screening* de doentes com suspeita de HPN,⁷⁹ contudo o CD59 dos granulócitos do CELLQUANT tem uma taxa elevada de falsos positivos.⁹⁶ Estes *kits* têm a vantagem de fornecerem valores calibrados para determinar o *cut-off* da expressão do CD55 e CD59 nos eritrócitos e granulócitos.^{79,96} A avaliação do CD66b nos granulócitos e do CD14 nos monócitos também tem um bom desempenho e pode ser um suplemento viável e relativamente barato.⁹⁶ O CD58 e CD59 nos reticulócitos e eritrócitos, o CD24/66b nos granulócitos e o CD14 nos monócitos, são os mais efetivos na citometria de fluxo. A avaliação de, pelo menos, duas proteínas ancoradas ao GPI nos granulócitos, eritrócitos e reticulócitos constitui um método simples e rápido que deteta populações de células deficientes, mesmo sendo pequenas.⁹² A variabilidade nos métodos de deteção dos antígenos ancorados ao GPI, pelo facto de existir uma ampla variedade de antígenos que podem ser utilizados em várias combinações, destaca a necessidade de criar protocolos para a citometria de fluxo no diagnóstico da HPN.⁹⁷

A citometria de fluxo a uma cor é suficientemente sensível para detetar células deficientes em proteínas ancoradas ao GPI na ordem dos 3%.⁸⁰ Contudo, a citometria de fluxo multicolor é uma mais-valia como técnica de *screening* e diagnóstico da HPN, pela sua rapidez, sensibilidade e especificidade. A análise multicolor dos eritrócitos permite identificar pequenas populações HPN na ordem dos 0,01%, que, apesar de não ser um valor exigido no diagnóstico da patologia, é útil nos casos de AA. Esta precisão de valores também é importante na monitorização a longo prazo dos doentes, particularmente naqueles em que o clone regride espontaneamente.⁸⁷ A citometria de fluxo com avaliação de múltiplos parâmetros tem a vantagem de permitir a análise dos vários tipos de células para várias proteínas ancoradas ao GPI de forma rápida e quantitativa.⁹⁶

As várias técnicas utilizadas para o diagnóstico da HPN variam quanto à sensibilidade, sendo a citometria de fluxo a mais sensível e os testes de lise os menos sensíveis. No entanto, a especificidade é de 100% nos testes líticos assim como no “*gel card test*”.⁸³ A citometria de fluxo tem maior reprodutibilidade que os testes bioquímicos já que os reagentes são padronizados.⁸⁰

Recentemente, surgiu um novo reagente que marca as células deficientes em GPI. A aerolisina é uma toxina proveniente da *Aeromonas hydrophila*, que se liga diretamente ao GPI.⁹⁹ É secretada na sua forma inativa, proaerolisina, e convertida por proteases na forma ativa, levando à formação de canais heptaméricos na membrana da célula com consequente lise celular.¹⁰⁰ A resistência das células HPN à aerolisina permite diagnosticar a HPN de forma simples, sensível e específica.¹⁰¹ Com a introdução de duas mutações pontuais, a proaerolisina perde a atividade lítica, mas mantém a capacidade de ligação ao GPI, e, acoplada a um marcador fluorescente (Alexa Fluor 488), resulta num reagente (FLAER) que marca as células com proteínas ancoradas ao GPI. A técnica com utilização do FLAER é menos complexa que a análise dos antigénios. O FLAER pode ser utilizado para investigar todo o tipo de células, exceto o clone HPN na linhagem eritrocitária, uma vez que os eritrócitos não possuem as proteases necessárias ao processamento da proaerolisina.⁹¹ Além disso, a utilidade do FLAER nos eritrócitos também é limitada pelo facto de expressarem grandes quantidades de glicoforina, uma proteína não ancorada ao GPI, que é capaz de se ligar à aerolisina, embora fracamente.¹⁰²

O ensaio FLAER é mais sensível e fiável que a citometria de fluxo com anticorpos monoclonais, particularmente o anti-CD59, na deteção do tamanho do clone HPN e monitorização dos níveis após terapêutica,⁹¹ identificando populações de granulócitos HPN de aproximadamente 0,5%.⁹⁸ Os anticorpos monoclonais podem originar resultados falsos negativos, nomeadamente na deficiência congénita de CD59 e CD55, que não ocorrem com o reagente FLAER.⁹¹ O teste pode ser utilizado em amostras guardadas durante um período de 24 a 48 horas, uma vantagem em relação à citometria de fluxo nos granulócitos que deve ser efetuada até 8 horas após a colheita da amostra.⁹⁰ Um estudo comparativo mostrou que o reagente FLAER nos leucócitos é superior na quantificação do clone HPN, relativamente ao ensaio CD59 nos eritrócitos, tendo melhor custo-eficácia como teste de *screening* primário.¹⁰³ No entanto, o FLAER não substitui completamente a necessidade de imunofenotipagem já que a análise dos eritrócitos com anti-CD59 é útil na monitorização dos doentes sob terapêutica com eculizumab.⁸² O reagente FLAER pode ser utilizado como marcador único ou pode ser associado a outros anticorpos contra antigénios, ancorados ou não ao GPI, aumentando a confiança na deteção de clones HPN subclínicos.⁸⁷ A combinação do FLAER e da citometria de fluxo com avaliação de múltiplos parâmetros aumenta a sensibilidade e especificidade no diagnóstico da HPN.⁹⁰

O FLAER parece ser útil na identificação de indivíduos com risco de trombose, bem como de outras manifestações clínicas. De facto, grandes clones HPN estão associados a um aumento do risco de trombose e, há evidência de que o tamanho do clone HPN prediz a ocorrência de outros sintomas como dor abdominal, hemólise, espasmo esofágico e disfunção erétil.⁴⁵ A percentagem de células FLAER-negativas correlaciona-se com a atividade hemolítica e poderá ter utilidade na determinação da gravidade da doença e na avaliação da resposta ao tratamento.⁹⁸

A aerolisina pode ligar-se a proteínas N-glicolisadas além das proteínas ancoradas ao GPI o que dificulta a diferenciação entre defeitos nas biossíntese de GPI e N-glicosilação. A alfa toxina do *Clostridium septicum*, homóloga da aerolisina, tem a vantagem de não se ligar aos N-glicanos e poderá ser desenvolvida como técnica de diagnóstico.¹⁰⁴

Novas terapêuticas

O único tratamento curativo para a HPN é o transplante de células hematopoiéticas, contudo existe um risco considerável de mortalidade e morbidade,^{4,105} e a maioria dos doentes não são candidatos ou não tem um dador compatível.³⁸ Até há pouco tempo atrás, o tratamento da HPN era predominantemente de suporte, incluindo suplementos de ácido fólico, transfusões, suplementos de ferro e, em alguns casos, quelação do ferro quando as transfusões resultavam em excesso de ferro.¹⁰⁵

O Eculizumab é um anticorpo monoclonal humanizado dirigido contra a proteína C5 do complemento terminal. Inibe a clivagem em C5a e C5b, o que previne a libertação do mediador inflamatório C5a e a formação do MAC (C5b-C9), preservando os componentes iniciais do complemento essenciais à opsonização dos microrganismos e *clearance* dos complexos imunes.¹⁰⁶ O bloqueio dos componentes terminais do complemento, parece prolongar a sobrevivência dos eritrócitos HPN III, altamente sensíveis à lise mediada pelo complemento, aumentando assim a proporção destas células no sangue com redução dos sinais de hemólise.¹⁰⁷ Por outro lado, o bloqueio do complemento terminal resulta no aumento de risco de infeções por organismos encapsulados, nomeadamente por *Neisseria meningitidis*. Os doentes devem ser vacinados duas semanas antes de iniciarem o fármaco, exceto doentes críticos em que o eculizumab deve ser iniciado imediatamente, e repetir a vacina a

cada 2 a 3 anos. Além disso, deverão também ser alertados para os sintomas de infecção meningea de modo a poderem ser tratados rapidamente.¹⁰⁸

O Eculizumab, aprovado em 2007 pela Food and Drug Administration (FDA), foi avaliado em três estudos: um estudo piloto de fase 2 e dois estudos de fase 3. O estudo piloto de fase 2 mostrou que o nível de lactato desidrogenase (LDH) diminuiu rapidamente e manteve-se reduzido, enquanto o nível sérico de eculizumab foi superior a 35 µg/mL. A necessidade de transfusão foi significativamente reduzida, mesmo sem alteração dos níveis de hemoglobina prévios ao tratamento. A estabilização dos níveis de hemoglobina, com necessidade reduzida ou sem necessidade de transfusão, resulta da proteção dos eritrócitos HPN contra a lise mediada pelo complemento. Houve uma rápida melhoria na qualidade de vida durante o tratamento com o eculizumab, o que suporta a hipótese de muitas das manifestações clínicas estarem relacionadas com a hemólise.¹⁰⁷ Este estudo foi posteriormente estendido, no sentido de avaliar a eficácia e segurança do fármaco. De facto, a redução acentuada do nível de LDH manteve-se, demonstrando a inibição eficaz e prolongada da hemólise intravascular. O nível de LDH pode, assim, funcionar como indicador da hemólise intravascular e a sua monitorização avalia o bloqueio efetivo do complemento durante o tratamento com o eculizumab. A redução na necessidade de transfusões também se manteve, bem como a melhoria na qualidade de vida.¹⁰⁹

O estudo de fase 3 TRIUMPH mostrou uma redução na taxa de transfusão de 73% no grupo tratado com eculizumab relativamente ao grupo do placebo e, mesmo nos doentes em que a independência da transfusão não foi alcançada, houve uma redução de 44% no número de unidades de glóbulos rubros transfundidas. O nível de LDH foi imediatamente reduzido em todos os doentes do grupo eculizumab. Antes do tratamento com eculizumab, os níveis de hemoglobina eram mantidos pelas transfusões, pelo que a estabilização da hemoglobina durante o tratamento com a cessação ou redução das transfusões indica um aumento da massa eritrocitária. A redução da hemólise intravascular foi associada a uma melhoria significativa na fadiga apesar de não haver resolução completa da anemia, o que prova a contribuição da hemólise na diminuição da qualidade de vida. Os efeitos laterais foram semelhantes em ambos os grupos.¹¹⁰ O eculizumab também mostrou melhorar os sintomas atribuídos especificamente à hemólise, incluindo a hemoglobinúria, dor abdominal, disfagia e disfunção erétil.¹¹¹

O estudo de fase 3 SHEPHERD incluiu uma ampla população de doentes com vários níveis de hemólise e trombocitopenia e mostrou também a eficácia e segurança do eculizumab, com redução da hemólise em todos os doentes e consequente melhoria na anemia, necessidade de transfusões, fadiga e qualidade de vida.¹¹²

Dos 195 doentes que participaram no estudo piloto, TRIUMPH e SHEPHERD, 187 foram escolhidos para receber eculizumab por 2 anos num estudo aberto. Este comparou a taxa de tromboembolismo durante o tratamento com o eculizumab com a taxa pré-tratamento nos mesmos doentes e os resultados mostraram que o fármaco diminui o risco de tromboembolismo nos doentes com HPN.¹¹³ Doentes anticoagulados com varfarina ou heparina tem uma taxa de trombose elevada antes do eculizumab que, virtualmente desaparece quando eculizumab é adicionado à anticoagulação.¹⁰⁸ No entanto, continua por esclarecer se o eculizumab deve ser associado ou não à anticoagulação. A profilaxia primária com varfarina reduziu o risco de trombose nos doentes com HPN mas é necessário ponderar o risco-benefício devido à possibilidade de ocorrência de hemorragia.¹¹⁴

O eculizumab reduz a hemólise independentemente da necessidade de transfusão previamente ao tratamento ou, se durante o mesmo, se tornam independentes ou não. Os doentes com maior necessidade de transfusão antes do eculizumab são os que apresentam maior redução absoluta na necessidade. A redução da hemólise está associada a uma aumento nas contagens dos clones HPN, enquanto a contagem dos reticulócitos continua elevada sugerindo que, apesar do eculizumab, existe algum grau de destruição de eritrócitos HPN.¹¹⁵

Os doentes com HPN apresentam ativação da coagulação na ausência de trombose ativa e ativação das células endoteliais na ausência de inflamação sistémica. O eculizumab reduz a ativação da coagulação e fibrinólise e diminui significativamente os níveis plasmáticos dos marcadores de ativação endotelial, o que aponta para um papel das células endoteliais na ocorrência de trombose.¹¹⁶

Apesar da diminuição da hemólise com o eculizumab, apenas um pequeno grupo de doentes atinge valores de hemoglobina e LDH próximos do normal. A maioria mantém reticulocitose, haptoglobina indetetável e bilirrubina não conjugada aumentada, sugerindo hemólise persistente. Os doentes sob eculizumab tem uma proporção substancial de C3 ligado à superfície dos eritrócitos,^{117,118} explicado pelo facto de o eculizumab bloquear apenas a via do complemento a nível do C5, os passos anteriores da cascata não são afetados incluindo a ativação, deposição e clivagem

proteolítica do C3 em C3b. Os eritrócitos C3⁺ são reconhecidos pelos macrófagos o que poderá explicar a hemólise de origem extravascular.^{117,119} A deficiência do CD55 na HPN aumenta a formação do C3b mas esta não é clinicamente significativa uma vez que a lise das células se deve principalmente ao MAC. No entanto, com o eculizumab, não há formação do MAC e a importância do CD55 é revelada.¹¹⁸

O eculizumab deverá ser considerado nos doentes com sintomas importantes de hemólise, que não são adequadamente controlados com transfusões (Grau de recomendação 1A), sendo que o custo e a falta de acesso a esta medicação poderão influenciar esta decisão.¹²⁰ Os doentes com clones HPN inferiores a 10% raramente necessitam de terapêutica e deverão ser monitorizados devido à possibilidade de ocorrência de expansão clonal.¹²¹

Um novo anticorpo monoclonal está a ser estudado no sentido de melhorar a terapêutica da HPN, o 3E7/H17. Este inibe a hemólise mediada pela via alternativa do complemento e a deposição de C3, sem comprometer a via clássica do complemento. Este anticorpo constitui uma nova abordagem em que a hemólise intra e extravascular pode ser inibida preservando as funções imunes da via clássica do complemento.¹²²

Outra das possibilidades terapêuticas passa pela substituição do CD59. Uma forma recombinante transmembranar de CD59 (CD59-TM) foi estudada e mostrou níveis similares de proteção contra o dano mediado pelo complemento com quantidades idênticas de CD59-TM e CD59 nativo, sugerindo que uma forma funcional de CD59 pode ser expressa nas células através de terapia génica.¹²³ Mais recentemente, foi descrito o uso de uma forma sintética de CD59, o rhCd59-P, uma proteína solúvel que se liga à membrana celular. Esta forma corrige a deficiência do CD59 *in vitro* e uma injeção intravenosa em ratos protege efetivamente os eritrócitos contra a lise pelo complemento humano durante pelo menos 24 horas, enquanto o rhCD59-P permanecer em circulação, constituindo assim um candidato a testar em humanos.¹²⁴ O princípio da terapia génica na HPN foi aplicado no desenvolvimento de um vetor retroviral, o MPIN, com a sequência codificadora do PIG-A. Este foi capaz de reestabelecer as proteínas ancoradas ao GPI em várias linhagens celulares com o fenótipo HPN resistindo assim à hemólise.¹²⁵

Conclusão

Embora sendo uma patologia rara, a HPN suscitou o interesse de vários investigadores no sentido de compreender a sua fisiopatologia. De facto, nas últimas

duas décadas, foram grandes os avanços com a descoberta do defeito funcional e do gene responsável. Recentemente, a melhor compreensão dos mecanismos fisiopatológicos alterou a abordagem diagnóstica e terapêutica desta patologia com potencial para modificar a história natural da doença.

As mutações somáticas do gene PIG-A responsável pela HPN são diversas, pelo que a análise genética das mutações poderá ser decisiva na modificação da abordagem à doença. Apesar da elucidação atual de possíveis mecanismos implicados na expansão clonal e nas próprias manifestações clínicas da HPN, ainda não há uma total compreensão destes fenómenos e as contínuas descobertas na fisiopatologia poderão constituir novos alvos de abordagem a alterar.

A citometria de fluxo tornou-se o método de escolha no diagnóstico da doença pela sua sensibilidade e especificidade, permitindo quantificar o tamanho do clone HPN, o que torna esta técnica útil também na monitorização dos doentes. Contudo, a variedade de métodos utilizados pelos laboratórios torna evidente a necessidade de estabelecer *guidelines* internacionais.

A abordagem terapêutica da HPN mudou radicalmente com a introdução do eculizumab. Os estudos mostram que é um fármaco seguro e bem tolerado e diminui a hemólise intravascular, reduz ou elimina a necessidade de transfusão, melhora a anemia, fadiga e a qualidade de vida. No entanto, ainda não há resultados de longo termo sobre o custo-eficácia desta nova abordagem terapêutica. Além disso, a hemólise extravascular mediada pelo C3, evidenciada pela utilização do eculizumab, constitui um novo desafio no tratamento da HPN.

Referências

1. Hill A, Philip JP, Simth A, Richards SJ, Cullen MJ, Hill QA, Roman E, Hillmen P. The incidence and prevalence of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) and survival of patients in Yorkshire. *ASH Annual Meeting Abstracts* 2006;108:985.
2. Parker CJ, Ware RE. Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria. In: Greer JP, Foerster J, Rodgers GM, *et al.* *Wintrobe's Clinical Hematology*, 12th edition. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2009:998-1020.
3. Parker C, Omine M, Richards S, Nishimura J, Bessler M, Ware R, Hillmen P, Luzzatto L, Young N, Kinoshita T, Rosse W, Socié G; International PNH Interest Group. Diagnosis and management of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 2005;106(12):3699-709.

4. Hill A, Richards SJ, Hillmen P. Recent developments in the understanding and management of paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *Br J Haematol* 2007;137(3):181-92.
5. Rother RP, Bell L, Hillmen P, Gladwin MT. The clinical sequelae of intravascular hemolysis and extracellular plasma hemoglobin: a novel mechanism of human disease. *JAMA* 2005;293(13):1653-62.
6. Hillmen P, Lewis SM, Bessler M, Luzzatto L, Dacie JV. Natural history of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *N Engl J Med* 1995;333(19):1253-8.
7. Hillmen P, Richards SJ. Implications of recent insights into the pathophysiology of paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *Br J Haematol* 2000;108(3):470-9.
8. De Latour RP, Mary JY, Salanoubat C, Terriou L, Etienne G, Mohty M, Roth S, de Guibert S, Maury S, Cahn JY, Socié G; French Society of Hematology; French Association of Young Hematologists. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: natural history of disease subcategories. *Blood* 2008;112(8):3099-106.
9. Parker CJ. Historical aspects of paroxysmal nocturnal haemoglobinuria: 'defining the disease'. *Br J Haematol*. 2002;117(1):3-22.
10. Takeda J, Miyata T, Kawagoe K, Iida Y, Endo Y, Fujita T, Takahashi M, Kitani T, Kinoshita T. Deficiency of the GPI anchor caused by a somatic mutation of the PIG-A gene in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Cell* 1993;73:703-711.
11. Miyata T, Yamada N, Iida Y, Nishimura J, Takeda J, Kitani T, Kinoshita T. Abnormalities of the PIG-A transcripts in granulocytes from patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *New England Journal of Medicine* 1994;330:249-255.
12. Bessler M, Mason PJ, Hillmen P, Miyata T, Yamada N, Takeda J, Luzzatto L, Kinoshita T. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) is caused by somatic mutations in the PIG-A gene. *EMBO J* 1994;13(1):110-7.
13. Miyata T, Takeda J, Iida I, Yamada N, Inoue N, Takahashi M, Maeda K, Kitani T, Kinoshita T. The cloning of PIG-A, a component in the early step of GPI-anchor biosynthesis. *Science* 1993;259:1318-1320.
14. Takahashi M, Takeda J, Hirose S, Hyman R, Inoue N, Miyata T, Ueda E, Kitani T, Medof ME, Kinoshita T. Deficient biosynthesis of N-Acetylglucosaminyl-phosphatidylinositol. The first intermediate of glycosyl phosphatidylinositol anchor biosynthesis, in cell lines established from patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *J Exp Med* 1993;177:517-521.
15. Hillmen P, Bessler M, Mason PJ, Watkins WM, Luzzatto L. Specific defect in N-acetylglucosamine incorporation in the GPI anchor synthetic pathway in cloned

cell lines from patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. Proceedings of the National Academy of Science of the USA 1993;90:5272-5276.

16. Savage WJ, Brodsky RA. New insights into paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Hematology* 2007;12(5):371-6.
17. Parker CJ. The pathophysiology of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Exp Hematol* 2007;35(4):523-33.
18. Luzzatto L. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: an acquired X-linked genetic disease with somatic-cell mosaicism. *Curr Opin Genet Dev* 2006;16(3):317-22.
19. Johnson RJ, Hillmen P. Paroxysmal nocturnal haemoglobinuria: nature's gene therapy? *Mol Pathol* 2002;55(3):145-52.
20. Bessler M, Hiken J. The pathophysiology of disease in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2008:104-10.
21. Nafa K, Mason PJ, Hillmen P, Luzzatto L, Bessler M. Mutations in the PIG-A gene causing paroxysmal nocturnal hemoglobinuria are mainly of the frameshift type. *Blood* 1995;86(12):4650-5.
22. Brodsky RA, Hu R. PIG-A mutations in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and in normal hematopoiesis. *Leuk Lymphoma*. 2006;47(7):1215-21.
23. Rosti V. The molecular basis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Haematologica*. 2000;85(1):82-7.
24. Endo M, Ware RE, Vreeke TM, Singh SP, Howard TA, Tomita A, Holguin MH, Parke. Molecular basis of the heterogeneity of expression of glycosyl phosphatidylinositol anchored proteins in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 1996;87(6):2546-57.
25. Mortazavi Y, Merk B, McIntosh J, Marsh JC, Schrezenmeier H, Rutherford TR; BIOMED II Pathophysiology and treatment of Aplastic Anaemia Study Group. The spectrum of PIG-A gene mutations in aplastic anemia/paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (AA/PNH): a high incidence of multiple mutations and evidence of a mutational hot spot. *Blood* 2003;101(7):2833-41.
26. Nishimura J, Inoue N, Wada H, Ueda E, Pramoongjago P, Hirota T, Machii T, Kageyama T, Kanamaru A, Takeda J, Kinoshita T, Kitani T. A patient with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria bearing four independent PIG-A mutant clones. *Blood* 1997;89(9):3470-6.
27. Araten DJ, Luzzatto L. The mutation rate in PIG-A is normal in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH). *Blood* 2006;108(2):734-6.
28. Hu R, Mukhina GL, Piantadosi S, Barber JP, Jones RJ, Brodsky RA. PIG-A mutation in normal hematopoiesis. *Blood* 2005;105(10):3848-54.

29. Almeida AM, Murakami Y, Layton DM, Hillmen P, Sellick GS, Maeda Y, Richards S, Patterson S, Kotsianidis I, Mollica L, Crawford DH, Baker A, Ferguson M, Roberts I, Houlston R, Kinoshita T, Karadimitris A. Hypomorphic promoter mutation in PIG-M causes inherited glycosylphosphatidylinositol deficiency. *Nat Med* 2006;12(7):846-51.
30. Almeida AM, Murakami Y, Baker A, Maeda Y, Roberts IA, Kinoshita T, Layton DM, Karadimitris A. Targeted therapy for inherited GPI deficiency. *N Engl J Med* 2007;356(16):1641-7.
31. Meri S, Morgan BP, Davies A, Daniels RH, Olavesen MG, Waldmann H, Lachmann PJ. Human protectin (CD59), an 18,000-20,000 MW complement lysis restricting factor, inhibits C5b-8 catalysed insertion of C9 into lipid bilayers. *Immunology* 1990;71(1):1-9.
32. Medof ME, Kinoshita T, Nussenzweig V. Inhibition of complement activation on the surface of cells after incorporation of decay-accelerating factor (DAF) into their membranes. *J Exp Med* 1984;160(5):1558-78.
33. Medof ME, Kinoshita T, Silber R, Nussenzweig V. Amelioration of lytic abnormalities of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria with decay-accelerating factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985;82(9):2980-4.
34. Wilcox LA, Ezzell JL, Bernshaw NJ, Parker CJ. Molecular basis of the enhanced susceptibility of the erythrocytes of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria to hemolysis in acidified serum. *Blood* 1991;78(3):820-9.
35. Rosse WF, Ware RE. The molecular basis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 1999;86(9):3277-86.
36. Ruiz-Delgado GJ, Vásquez-Garza E, Méndez-Ramírez N, Gómez-Almaguer D. Abnormalities in the expression of CD55 and CD59 surface molecules on peripheral blood cells are not specific to paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Hematology* 2009;14(1):33-7.
37. Walport MJ. Complement. First of two parts. *N Engl J Med* 2001;344(14):1058-66.
38. Brodsky RA. Advances in the diagnosis and therapy of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood Rev* 2008;22(2):65-74.
39. Wiedmer T, Hall SE, Ortel TL, Kane WH, Rosse WF, Sims PJ. Complement-induced vesiculation and exposure of membrane prothrombinase sites in platelets if paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 1993;82(4):1192-6.
40. Basu S, Banerjee D, Ghosh M, Chakrabarti A. Erythrocyte membrane defects and asymmetry in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and myelodysplastic syndrome. *Hematology* 2010;15(4):236-9.

41. Rosse WF. Phosphatidylinositol-linked proteins and paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 1990;75(8):1595-601.
42. Christmas SE, de la Mata Espinosa CT, Halliday D, Buxton CA, Cummerson JA, Johnson PM. Levels of expression of complement regulatory proteins CD46, CD55 and CD59 on resting and activated human peripheral blood leucocytes. *Immunology* 2006;119(4):522-8.
43. Reiter CD, Wang X, Tanus-Santos JE, Hogg N, Cannon RO 3rd, Schechter AN, Gladwin MT. Cell-free hemoglobin limits nitric oxide bioavailability in sickle-cell disease. *Nat Med* 2002;8(12):1383-9.
44. Morris CR, Kato GJ, Poljakovic M, Wang X, Blackwelder WC, Sachdev V, Hazen SL, Vichinsky EP, Morris SM Jr, Gladwin MT. Dysregulated arginine metabolism, hemolysis-associated pulmonary hypertension, and mortality in sickle cell disease. *JAMA* 2005;294(1):81-90.
45. Moyo VM, Mukhina GL, Garrett ES, Brodsky RA. Natural history of paroxysmal nocturnal haemoglobinuria using modern diagnostic assays. *Br J Haematol* 2004;126(1):133-8.
46. Megson IL, Sogo N, Mazzei FA, Butler AR, Walton JC, Webb DJ. Inhibition of human platelet aggregation by a novel S-nitrosothiol is abolished by haemoglobin and red cells in vitro: implications for anti-thrombotic therapy. *Br J Pharmacol* 2000;131(7):1391-8.
47. Radomski MW, Palmer RM, Moncada S. The anti-aggregating properties of vascular endothelium: interactions between prostacyclin and nitric oxide. *Br J Pharmacol* 1987;92:639-646.
48. Schäfer A, Wiesmann F, Neubauer S, Eigenthaler M, Bauersachs J, Channon KM. Rapid regulation of platelet activation in vivo by nitric oxide. *Circulation* 2004;109(15):1819-22.
49. Sims PJ, Rollins SA, Wiedmer T. Regulatory control of complement on blood platelets. Modulation of platelet procoagulant responses by a membrane inhibitor of the C5b-9 complex. *J Biol Chem* 1989;264(32):19228-35.
50. Hugel B, Socié G, Vu T, Toti F, Gluckman E, Freyssinet JM, Scrobohaci ML. Elevated levels of circulating procoagulant microparticles in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and aplastic anemia. *Blood* 1999;93(10):3451-6.
51. Sims PJ, Faioni EM, Wiedmer T, Shattil SJ. Complement proteins C5b-9 release of membrane vesicles from the platelet surface that are enriched in the membrane receptor for coagulation factor Va and express prothrombinase activity. *J Biol Chem* 1988;263 (34):18205-12.

52. Simak J, Holada K, Risitano AM, Zivny JH, Young NS, Vostal JG. Elevated circulating endothelial membrane microparticles in paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *Br J Haematol* 2004;125(6):804-13.
53. Ploug M, Plesner T, Rønne E, Ellis V, Høyer-Hansen G, Hansen NE, Danø K. The receptor for urokinase-type plasminogen activator is deficient on peripheral blood leukocytes in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 1992;79(6):1447-55.
54. Maroney SA, Cunningham AC, Ferrel J, Hu R, Haberichter S, Mansbach CM, Brodsky RA, Dietzen DJ, Mast AE. A GPI-anchored co-receptor for tissue factor pathway inhibitor controls its intracellular trafficking and cell surface expression. *J Thromb Haemost* 2006;4(5):1114-24.
55. Jankowska AM, Szpurka H, Calabro M, Mohan S, Schade AE, Clemente M, Silverstein RL, Maciejewski JP. Loss of expression of neutrophil proteinase-3: a contributory factor in thrombotic risk in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Haematologica* 2001.
56. Brodsky RA. How do PIG-A mutant paroxysmal nocturnal hemoglobinuria stem cells achieve clonal dominance? *Expert Rev Hematol* 2009;2(3):353-6.
57. Karadimitris A, Luzzatto L. The cellular pathogenesis of paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *Leukemia* 2001;15(8):1148-52.
58. Murakami Y, Kosaka H, Maeda Y, Nishimura J, Inoue N, Ohishi K, Okabe M, Takeda J, Kinoshita T. Inefficient response of T lymphocytes to glycosylphosphatidylinositol anchor-negative cells: implications for paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 2002;100(12):4116-22.
59. Karadimitris A, Manavalan JS, Thaler HT, Notaro R, Araten DJ, Nafa K, Roberts IA, Weksler ME, Luzzatto L. Abnormal T-cell repertoire is consistent with immune process underlying the pathogenesis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 2000;96(7):2613-20.
60. Visconte V, Raghavachari N, Liu D, Keyvanfar K, Desierto MJ, Chen J, Young NS. Phenotypic and functional characterization of a mouse model of targeted Pig-a deletion in hematopoietic cells. *Haematologica* 2010;95(2):214-23.
61. Brodsky RA, Vala MS, Barber JP, Medof ME, Jones RJ. Resistance to apoptosis caused by PIG-A gene mutations in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94(16):8756-60.
62. Horikawa K, Nakakuma H, Kawaguchi T, Iwamoto N, Nagakura S, Kagimoto T, Takatsuki K. Apoptosis resistance of blood cells from patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria, aplastic anemia, and myelodysplastic syndrome. *Blood* 1997;90(7):2716-22.
63. Ware RE, Nishimura J, Moody MA, Smith C, Rosse WF, Howard TA. The PIG-A mutation and absence of glycosylphosphatidylinositol-linked proteins do not

- confer resistance to apoptosis in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 1998;92(7):2541-50.
64. Savage WJ, Barber JP, Mukhina GL, Hu R, Chen G, Matsui W, Thoburn C, Hess AD, Cheng L, Jones RJ, Brodsky RA. Glycosylphosphatidylinositol-anchored protein deficiency confers resistance to apoptosis in PNH. *Exp Hematol* 2009;37(1):42-51.
 65. Chen R, Nagarajan S, Prince GM, Maheshwari U, Terstappen LW, Kaplan DR, Gerson SL, Albert JM, Dunn DE, Lazarus HM, Medof ME. Impaired growth and elevated fas receptor expression in PIGA(+) stem cells in primary paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *J Clin Invest* 2000;106(5):689-96.
 66. Szpurka H, Schade AE, Jankowska AM, Maciejewski JP. Altered lipid raft composition and defective cell death signal transduction in glycosylphosphatidylinositol anchor-deficient PIG-A mutant cells. *Br J Haematol* 2008;142(3):413-22.
 67. Nagakura S, Ishihara S, Dunn DE, Nishimura J, Kawaguchi T, Horikawa K, Hidaka M, Kagimoto T, Eto N, Mitsuya H, Kinoshita T, Young NS, Nakakuma H. Decreased susceptibility of leukemic cells with PIG-A mutation to natural Killer cells in vitro. *Blood* 2002;100(3):1031-7.
 68. Hanaoka N, Kawaguchi T, Horikawa K, Nagakura S, Mitsuya H, Nakakuma H. Immunoselection by natural killer cells of PIGA mutant cells missing stress-inducible ULBP. *Blood* 2006;107(3):1184-91.
 69. Hanaoka N, Nakakuma H, Horikawa K, Nagakura S, Tsuzuki Y, Shimanuki M, Kojima K, Yonemura Y, Kawaguchi T. NKG2D-mediated immunity underlying paroxysmal nocturnal haemoglobinuria and related bone marrow failure syndromes. *Br J Haematol* 2009;146(5):538-45.
 70. Poggi A, Negrini S, Zocchi MR, Massaro AM, Garbarino L, Lastraioli S, Gargiulo L, Luzzato L, Notaro R. Patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria have a high frequency of peripheral-blood T cells expressing activating isoforms of inhibiting superfamily receptors. *Blood* 2005;106(7):2399-408.
 71. Barcellini W, Fermo E, Guia Imperiali F, Zaninoni A, Bianchi P, Boschetti C, Zanella A. Increased resistance of PIG-A-bone marrow progenitors to tumor necrosis factor α and interferon γ : possible implications for the in vivo dominance of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria clones. *Haematologica* 2004;89(6):651-6.
 72. Chen G, Zeng W, Maciejewski JP, Kcyvanfar K, Billings EM, Young NS. Differential gene expression in hematopoietic progenitors from paroxysmal nocturnal hemoglobinuria patients reveals an apoptosis/immune response in "normal" phenotype cells. *Leukemia* 2005;19(5):862-8.

73. Inoue N, Izui-Sarumaru T, Murakami Y, Endo Y, Nishimura J, Kurokawa K, Kuwayama M, Shime H, Machii T, Kanakura Y, Meyers G, Witter C, Chen Z, Badcock W, Frei-Lahr D, Parker CJ, Kinoshita T. Molecular basis of clonal expansion of hematopoiesis in 2 patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH). *Blood* 2006;108(13):4232-6.
74. Kelley RJ, Tooze RM, Doody GM, Richards SJ, Hillmen P. The investigation of HMGA2 dysregulation and promoter mutations in PIG-M in the molecular pathogenesis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *ASH Annual Meeting Abstracts* 2007;110:3671.
75. Dingli D, Luzzatto L, Pacheco JM. Neutral evolution in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Proc Natl Acad USA* 2008;195(47):18496-500.
76. Bain BJ, Win N. Acquired haemolytic anemias. In: Lewis SM, Bain BJ, Bates I. Dacie and Lewis Practical Haematology, 10th edition. Philadelphia: Churchill Livingstone, 2006:260-266.
77. Krauss JS. Laboratory diagnosis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Ann Clin Lab Sci* 2003;33(4):401-6.
78. Hartmann RC, Jenkins DE Jr, Arnold AB. Diagnostic specificity of sucrose hemolysis test for paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 1970;35(4):462-75.
79. Oelschlaegel U, Besson I, Arnoulet C, Sainy D, Nowak R, Naumann R, Bux Y, Ehninger G. A standardized flow cytometric method for screening paroxysmal nocturnal haemoglobinuria (PNH) measuring CD55 and CD59 expression on erythrocytes and granulocytes. *Clin Lab Haematol* 2001;23(2):81-90.
80. Hall SE, Rosse WF. The use of monoclonal antibodies and flow cytometry in the diagnosis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 1996;87(12):5332-40.
81. Richards SJ, Rawstron AC, Hillmen P. Application of flow cytometry to the diagnosis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Cytometry* 2000;42(4):223-33.
82. Madkaikar M, Gupta M, Jijna F, Ghosh K. Paroxysmal nocturnal haemoglobinuria: diagnostic tests, advantages, & limitations. *Eur J Haematol* 2009;83(6):503-11.
83. Gupta R, Pandey P, Choudhry R, Kashyap R, Mehrota M, Naseem S, Nityanand S. A prospective comparison of four techniques for diagnosis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Int J Lab Hematol* 2007;29(2):119-26.
84. Hernández-Campo PM, Martín-Ayuso M, Almeida J, López A, Orfao A. Comparative analysis of different flow cytometry-based immunophenotypic methods for the analysis of CD59 and CD55 expression on major peripheral blood cell subsets. *Cytometry* 2002;50(3):191-201.

85. Hernández-Campo PM, Almeida J, Sánchez ML, Malvezzi M, Orfao A. Normal patterns of expression of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins on different subsets of peripheral blood cells: a frame of reference for the diagnosis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Cytometry B Clin Cytom* 2006; 70(2):71-81.
86. Hernández-Campo PM, Almeida J, Matarraz S, de Santiago M, Sánchez ML, Orfao A. Quantitative analysis of the expression of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins during the maturation of different hematopoietic cell compartments of normal bone marrow. *Cytometry B Clin Cytom* 2007;72(1):34-42.
87. Richards SJ, Hill A, Hillmen P. Recent advances in the diagnosis, monitoring, and management of patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Cytometry B Clin Cytom* 2007;72(5):291-8.
88. Piedras J, López-Karpovitch X. Flow cytometric analysis of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins to assess paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Cytometry* 2000;42(4):234-8.
89. Tembhare P, Ramani M, Syed K, Gupta AD. Flow cytometric analysis of erythrocytes in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria reveals superiority of CD59 as a diagnostic marker compared to CD55. *Indian J Pathol Microbiol* 2010;53(4):699-703.
90. Sutherland DR, Kuek N, Davidson J, Barth D, Chang H, Yeo E, Bamford S, Chin-Yee I, Keeney M. Diagnosing PNH with FLAER and multiparameter flow cytometry. *Cytometry B Clin Cytom* 2007;72(3):167-77.
91. Brodsky RA, Mekhina GL, Li S, Nelson KL, Chiurazzi PL, Buckley JT, Borowitz MJ. Improved detection and characterization of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria using fluorescent aerolysin. *Am J Clin Pathol* 2000;114(3):459-66.
92. Höchsmann B, Rojewski M, Schrezenmeier H. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH): higher sensitivity and validity in diagnosis and serial monitoring by flow cytometric analysis of reticulocytes. *Ann Hematol* 2011.
93. Cui W, Fan Y, Yang M, Zhang Z. Expression of CD59 on lymphocyte and the subsets and its potential clinical application for paroxysmal nocturnal hemoglobinuria diagnosis. *Clin Lab Haematol* 2004;26(2):95-100.
94. Richard SJ, Norfolk DR, Swirsky DM, Hillmen P. Lymphocyte subset analysis and glycosylphosphatidylinositol phenotype in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 1998;92(5):1799-806.
95. Nakakuma H, Nagakura S, Kawaguchi T, Iwamoto N, Hidaka M, Horikawa K, Kagimoto T, Tsuruzaki R, Takatsuki K. Persistence of affected T lymphocytes in long-term clinical remission in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 1994;84(11):3925-8.

96. Hsi ED. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria testing by flow cytometry. Evaluation of the REDQUANT and CELLQUANT kits. *Am J Clin Pathol* 2000;114(5):798-806.
97. Richards SJ, Whitby L, Cullen MJ, Dickinson AJ, Granger V, Reilly JT, Hillmen P, Barnett D. Development and evaluation of a stabilized whole-blood preparation as a process control material for screening of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria by flow cytometry. *Cytometry B Clin Cytom* 2008;76B(1):47-55.
98. Peghini PE, Fehr J. Clinical evaluation of an aerolysin-based screening test for paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *Cytometry B Clin Cytom* 2005;67(1):13-8.
99. Diep DB, Nelson KL, Raja SM, Pleshak EN, Buckley JT. Glycosylphosphatidylinositol anchors of membrane glycoproteins are binding determinants for the channel-forming toxin aerolysin. *J Biol Chem* 1998;273(4):2355-60.
100. Howard SP, Buckley JT. Activation of the hole-forming toxin aerolysin by extracellular processing. *J Bacteriol* 1985;163(1):336-40.
101. Brodsky RA, Mukhina GL, Nelson KL, Lawrence TS, Jones RJ, Buckley JT. Resistance of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria cells to the glycosylphosphatidylinositol-binding toxin aerolysin. *Blood* 1999;93(5):1749-56.
102. MacKenzie CR, Hiramata T, Buckley JT. Analysis of receptor binding by the channel-forming toxin aerolysin using surface plasmon resonance. *J Biol Chem* 1999;274(32):22604-9.
103. Sutherland DR, Kuek N, Azcona-Olivera J, Anderson T, Acton E, Barth D, Keeney M. Use of a FLAER-Based WBC Assay in the Primary Screening of PNH Clones. *Am J Clin Pathol* 2009;132(4):564-72.
104. Shin DJ, Cho D, Kim YR, Rhee JH, Choy HE, Lee JJ, Hong Y. Diagnosis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria by fluorescent clostridium septicum alpha toxin. *J Mol Microbiol Biotechnol* 2006;11(1-2):20-7.
105. Kelly R, Richard S, Hillmen P, Hill A. The pathophysiology of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and treatment with eculizumab. *Ther Clin Risk Manag* 2009;5:911-21.
106. Rother RP, Rollins SA, Mojcik CF, Brodsky RA, Bell L. Discovery and development of the complement inhibitor eculizumab for the treatment of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Nat Biotechnol* 2007;25(11):1256-64.
107. Hillmen P, Hall C, Marsh JC, Elebute M, Bombara MP, Petro BE, Cullen MJ, Richards SJ, Rollins SA, Mojcik CF, Rother RP. Effect of eculizumab on

- hemolysis and transfusion requirements in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *N Engl J Med* 2004;350(6):552-9.
108. Hillmen P. The role of complement inhibition in PNH. *Hematology Am Soc Hematol Educ program* 2008;116-23.
 109. Hill A, Hillmen P, Richards SJ, Elebute D, Marsh JC, Chan J, Mojciak CF, Rother RP. Sustained response and long-term safety of eculizumab in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 2005;106(7):2559-65.
 110. Hillmen P, Young NS, Schubert J, Brodsky RA, Socié G, Muus P, Röth A, Szer J, Elebute MO, Nakamura R, Browne P, Risitano AM, Hill A, Schrezenmeier H, Fu CL, Maciejewski J, Rollins SA, Mojciak CF, Rother RP, Luzzatto L. The complement inhibitor eculizumab in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *N Engl J Med* 2006;355(12):1233-43.
 111. Hill A, Rother RP, Hillmen P. Improvement in the symptoms of smooth muscle dystonia during eculizumab therapy in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Haematologica* 2005;90(12 Suppl):ECR40.
 112. Brodsky RA, Young NS, Antonioli E, Risitano AM, Schrezenmeier H, Schubert J, Gaya A, Coyle L, de Castro C, Fu CL, Maciejewski JP, Bessler M, Kroon HA, Rother RP, Hillmen P. Multicenter phase 3 study of the complement inhibitor eculizumab for the treatment of patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 2008;111(4):1840-7.
 113. Hillmen P, Muus P, Dührsen U, Risitano AM, Schubert J, Luzzatto L, Schrezenmeier H, Szer J, Brodsky RA, Hill A, Socié G, Bessler M, Rollins SA, Bell L, Rother RP, Young NS. Effect of the complement inhibitor eculizumab on thromboembolism in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 2007;110(12):4123-8.
 114. Hall C, Richards S, Hillmen P. Primary prophylaxis with warfarin prevents thrombosis in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH). *Blood* 2003;102(10):3587-91.
 115. Schubert J, Hillmen P, Röth A, Young NS, Elebute MO, Szer J, Gianfaldoni G, Socié G, Browne P, Geller R, Rother RP, Muus P; TRIUMPH Study Investigators. Eculizumab, a terminal complement inhibitor, improves anemia in patients with paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *Br J Haematol* 2008;142(2):263-72.
 116. Helley D, de Latour RP, Porcher R, Rodrigues CA, Galy-Fauroux I, Matheron J, Duval A, Schved JF, Fischer AM, Socié G; French Society of Hematology. Evaluation of hemostasis and endothelial function in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria receiving eculizumab. *Haematologica* 2010;95(4):574-81.
 117. Risitano AM, Notaro R, Marando L, Serio B, Ranaldi D, Seneca E, Ricci P, Alfinito F, Camera A, Gianfaldoni G, Amendola A, Boshetti C, Di Bona E,

- Fratellanza G, Barbano F, Rodeghiero F, Zanella A, Iori AP, Selleri C, Luzzatto L, Rotoli B. Complement fraction 3 binding on erythrocytes as additional mechanism of disease in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria patients treated by eculizumab. *Blood* 2009;113(17):4094-100.
118. Hill A, Rother RP, Arnold L, Kelly R, Cullen MJ, Richards SJ, Hillmen P. Eculizumab prevents intravascular hemolysis in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and unmasks low-level extravascular hemolysis occurring through C3 opsonization. *Haematologica* 2010;95(4):567-73.
119. Jasinski M, Pantazopoulos P, Rother RP, van Rooijen N, Song WC, Molina H, Bessler M. A novel mechanism of complement-independent clearance of red cells deficient in glycosyl phosphatidylinositol-linked proteins. *Blood* 2004;103(7):2827-34.
120. Haspel RL, Hillmen P. Which patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) should be treated with eculizumab? ASH evidence-based review 2008. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2008;35.
121. Brodsky RA. How I treat paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 2009;113:6522-6527.
122. Lindorfer MA, Pawluczkoysz AW, Peek EM, Hickman K, Taylor RP, Parker CJ. A novel approach to preventing the hemolysis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: both complement-mediated cytolysis and C3 deposition are blocked by a monoclonal antibody specific for the alternative pathway of complement. *Blood* 2010;115(11):2283-91.
123. Rother RP, Rollins SA, Mennone J, Chodera A, Fidel SA, Bessler M, Hillmen P, Squinto SP. Expression of recombinant transmembrane CD59 in Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria B cells confers resistance to human complement. *Blood* 1994;84(8):2604-11.
124. Hill A, Ridley SH, Esser D, Oldrovd RG, Cullen MJ, Kareclas P, Gallagher S, Smith GP, Richards SJ, White J, Smith RA, Hillmen P. Protection of erythrocytes from human complement-mediated lysis by membrane-targeted recombinant soluble CD59: a new approach to PNH therapy. *Blood*. 2006 Mar 1;107(5):2131-7.
125. Nishimura Ji, Phillips KL, Ware RE, Hall S, Wilson L, Gentry TL, Howard TA, Murakami Y, Shibano M, Machii T, Gilboa E, Kanakura Y, Takeda J, Kinoshita T, Rosse WF, Smith CA. Efficient retrovirus-mediated PIG-A gene transfer and stable restoration of GPI-anchored protein expression in cells with the PNH phenotype. *Blood* 2001;97(10):3004-10.